

A群溶連菌による誘起インターフェロンの抗腫瘍活性について

金沢大学医学部薬理学講座 (主任：正印 達教授)

菊 地 修 一

(昭和63年12月14日受付)

A群溶血性連鎖球菌 (溶連菌) の抗腫瘍性および非抗腫瘍性の菌株は共にインターフェロン (interferon, IFN) を誘起し、各誘起 IFN 間には定性・定量的に差が認められなかったことから各 IFN の生物活性を比較検討するため、抗腫瘍性でストレプトリジン S (streptolysin S, SLS) 産生能を有する A 群溶連菌 Su 株 (Su 菌)、溶連菌 C203S 株 (C203S 菌) および溶連菌 Blackmore 株 (Blackmore 菌)、ならびに非抗腫瘍性で SLS 産生能を欠く A 群溶連菌 C203U 株 (C203U 菌) による各誘起 IFN の抗腫瘍活性を比較検討した。これらの溶連菌の凍結乾燥標品は、Su 菌標品である OK-432 と同様の方法で調製した。すなわち、普通ブイヨン培地で20時間培養した各菌を、ペニシリン G 含有 Bernheimer 基礎液 (Bernheimer's basal medium) 中に浮遊させて、37°C で20分間続いて45°C で30分間静置した後、凍結乾燥した。このようにして得た菌標品と正常 BALB/c マウス脾細胞を37°C で48時間培養して誘起された上清液中の IFN 活性は、L929 細胞と vesicular stomatitis virus を用いて測定した。その結果、各上清液中の IFN 活性値/ml はほぼ同じであった。次に、各 IFN 含有培養上清液 (IFN 上清液) により活性化された脾細胞の抗腫瘍活性を腫瘍細胞中和試験 (Winn's assay) にて検討した。すなわち、IFN を 100U/ml または 30U/ml 含む IFN 上清液中で、正常 BALB/c マウス脾細胞を37°C で18時間インキュベートし、活性化脾細胞を準備した。次いで、Meth-A 肉腫細胞と活性化脾細胞を 1:10 の細胞比に混合した後、この混合細胞浮遊液をマウス側腹部皮下に移植し、腫瘍の増殖を21日間経時的に観察して、各活性化脾細胞の抗腫瘍活性を比較検討した。その結果、Su, Blackmore および C203U 菌標品により得られた IFN 上清液を用いて、IFN 濃度 100U/ml で活性化した脾細胞は、いずれも有意に腫瘍増殖を抑制した。このことより、抗腫瘍性を欠く C203U 菌が、抗腫瘍性を有する Su 菌および Blackmore 菌と同等に IFN を誘起し、かつ、Winn のテスト (Winn's assay) によって測定された誘起 IFN の生物学的活性にも差異がないことが示された。

Key words group A hemolytic streptococci, OK-432, mouse spleen cell, induced-interferon, Winn's assay

1868年、Busch¹⁾が、肉腫患者に丹毒が併発すると腫瘍が消滅・消失したことを報告して以来、多くの研究者ら^{2,3)}が溶血性連鎖球菌 (溶連菌) を悪性腫瘍の治療に用いることを試みた。しかし、その菌力のため、および効果の点から実用化には至らなかった。Okamoto は、1940年に核酸による A 群溶連菌のストレプトリジン S (streptolysin S, SLS) の増産効果⁴⁾を報告し、こ

れに基づいて、溶連菌の SLS 産生能および制がん作用に関する研究が進められた。1955年、Koshimura ら⁵⁾は、溶連菌が制がん効果を有することを実証し、1966年、Okamoto らは、同菌を弱毒化した溶連菌 Su 株 (Su 菌) をペニシリン G 加 Bernheimer 基礎液中で温度処理を行った結果、抗腫瘍作用が増大しかつ SLS 産生能の消失した PC-B-45^{6,7)} (OK-431) を開発し

Abbreviations: FCS, fetal calf serum; IFN, interferon; IL-1, interleukin-1; IL-2, interleukin-2; MEM, Eagle's minimum essential medium; NK, natural killer; KE, Klinische Einheit; PBS, phosphate-buffered saline; SLO, streptolysin O; SLS, streptolysin S; VSV,

た。その凍結乾燥標品である OK-432[®]は、現在、制がん剤として広く臨床および研究に用いられている。OK-432 の抗腫瘍効果の作用機序としては、直接作用としての腫瘍細胞障害作用⁸⁾⁹⁾のほか、宿主介在作用があることが明らかになっているが、最近では、その抗腫瘍効果は主に宿主介在作用によることが示唆されている。すなわち、OK-432 が、好中球¹⁰⁾、マクロファージ^{11)~14)} やナチュラルキラー細胞^{15)~17)} (natural killer cell, NK 細胞) の活性化を介して、あるいは、細胞障害性 T 細胞の分化・誘導¹⁸⁾¹⁹⁾ を介して制がん効果を示すことが明らかになっている。さらに、OK-432 は、インターフェロン^{20)~22)} (interferon, IFN) インターロイキン-1 (interleukin-1, IL-1) およびインターロイキン-2 (interleukin-2, IL-2)²³⁾²⁴⁾、NK 細胞活性化因子²⁴⁾²⁵⁾、腫瘍壊死因子²⁶⁾ などの誘起能をもつことが示され、これらサイトカインが各々のエフェクター細胞を活性化することにより、あるいは直接的に作用して抗腫瘍効果を示すことが報告されている。

一方、溶連菌による制がん効果は、SLS 産生能を有する溶連菌にのみ認められ、SLS 産生能を有しない溶連菌には認められないことが実証²⁷⁾²⁸⁾ されている。しかし、近年、池田²⁹⁾により、SLS 産生能および抗腫瘍性をもたない溶連菌が、SLS 産生能および抗腫瘍性を有する溶連菌と同様に、マウス脾細胞において IFN を誘起し、各誘起 IFN 間には定性・定量的に差がないことが報告された。このことから、本論文では、SLS 産生能を有し抗腫瘍性の溶連菌、および、SLS 産生能を欠き抗腫瘍性のない溶連菌により誘起された IFN の生物学的活性を比較検討するために、各誘起 IFN 含有培養上清液 (IFN 上清液) により処理された脾細胞を用いて Winn のテスト (Winn's assay)³⁰⁾ による抗腫瘍実験を行い、各誘起 IFN の脾細胞に対する

活性化作用について検討した。

材料および方法

I. 溶連菌株

金沢大学医学部薬理学教室保存の菌株、Su 菌 (Type 3, ATCC 21060)、溶連菌 C203S 株 (Type 3, C203S 菌)、溶連菌 C203U 株 (C203S 菌の変異株、C203U 菌) および溶連菌 Blackmore 株 (Type 11, Blackmore 菌) を用いた。各菌の性状は表 1 に示した如くである。また、各菌の継代培養には普通ブイヨン培地 (pH 7.4) を用いた。

II. 溶連菌標品の作製

各溶連菌のペニシリン処理標品は、OK-432 の調製法⁶⁾⁷⁾³¹⁾ に準じて作製した。すなわち、Su 菌、C203S 菌、C203U 菌あるいは Blackmore 菌の20時間普通ブイヨン培養液 1ml を 100ml 普通ブイヨンに接種し、37°C で20時間培養した後低温で遠心し、沈澱した生菌体を冷生理食塩水 40ml で 2 回洗浄した。次いで、洗浄菌体を 5 ml の Bernheimer 基礎液³²⁾ [マルトース 675mg, 20% KH₂PO₄ (NaOH で pH 7 に調整) 6 ml, 2% MgSO₄ · 7 H₂O 12ml, 蒸留水 66ml] に浮遊した。次いで、菌浮遊液に 1.6 × 10⁵ U/ml のペニシリン G (明治製菓、東京) 生理食塩水溶液 1 ml を加え、37°C で20分間、続いて45°C で30分間の加熱処理を行い、同処理液にさらに 1% DL-メチオニン-ペニシリン G (1.08 × 10⁵ U/ml) 液 6 ml を添加して凍結乾燥し各菌標品を作製した。

この様にして得られた標品を、それぞれ、OK-432 (または Su 菌標品)、C203S 菌標品、C203U 菌標品および Blackmore 菌標品とした。これら各標品は使用直前に磷酸緩衝食塩水 (pH 7.3) (phosphate-buffered saline, PBS) に溶解して用いた。各菌標品の量は KE

Table 1. Properties of hemolytic streptococci used in this study

Strain of hemolytic streptococci	Ability to produce		Anticancer ²⁸⁾ activity	IFN-induc ²⁹⁾ ing ability
	SLS ^{a)}	SLO ^{b)}		
Su	(+)	(+)	(+)	(+)
C203S	(+)	(+)	(+)	(+)
C203U (mutant of C203S)	(-)	(+)	(-)	(+)
Blackmore	(+)	(-)	(+)	(+)

a) SLS, streptolysin S.

b) SLO, streptolysin O.

vesicular stomatitis virus; Blackmore 菌、溶連菌 Blackmore 株; C203S 菌、溶連菌 C203S 株; C203U 菌、溶連菌 C203U 株; Su 菌、溶連菌 Su 株; 溶連菌、溶血性連鎖球菌。

(菌量の単位で、1 KE は乾燥菌 0.1mg に相当) で表示した。

III. 実験動物および腫瘍系

6週令、雄の BALB/cマウス (静岡実験動物農業共同組合、浜松) を実験に用いた。腫瘍は BALB/cマウスの腹腔内で継代維持している Meth-A 肉腫細胞を用いた。

IV. マウス脾細胞浮遊液の作製

脾細胞浮遊液の作製は Shirahata ら³⁰⁾の方法に準じて行った。すなわち、5匹のマウスを脊椎脱臼で殺した後、無菌的に摘出した脾臓を60mm 径プラスチックシャーレ 25010 (CORNING, New York) 内の Eagle's minimum essential medium (MEM) (日水製薬、東京) 3ml 中に置き、ハサミで細切しさらに1ml ツベルクリン注射器内筒底部を用いて破砕した後、新たに7ml MEM を加えて充分攪拌し、脾細胞を浮遊させた。この細胞浮遊液を金属メッシュで濾過して結合織を除去した後、遠心 (100g, 10分間) して上清液を吸引除去した。次いで、沈渣をトリス緩衝塩化アンモニウム溶液 [0.83% 塩化アンモニウム液と 0.17M トリス緩衝液 (pH 7.65) を 9:1 に混合] 4ml 中に浮遊させて充分攪拌し室温下に約3分間静置して赤血球を溶血させた後、MEM 8ml を加え遠心 (100g, 10分間) して上清液を吸引除去した。生じた沈渣を8ml MEM を用いて3回遠心・洗浄した後、適量の5% ウシ胎児血清 (fatal calf serum, FCS) (GIBCO, Grand Island) 加 RPMI 1640培地 (日水製薬) に浮遊させ、1時間水中に静置して沈澱物を除去した。次いで、この浮遊液中の生存脾細胞数を0.4% トリパンプルー (Merck, Darmstadt) による色素排除テスト (dye-exclusion test) により計数した後、さらに5% FCS 加 RPMI 1640培地を加えて希釈し、 $2 \sim 11 \times 10^7$ 細胞/ml の脾細胞浮遊液を作製した。実験には、5% FCS 加 RPMI 1640培地で希釈した脾細胞浮遊液を用いた。

V. 各溶連菌標品による IFN の誘起実験

菌標品のマウス脾細胞での誘起 IFN 活性については、池田³⁰⁾により、最も高い活性値が、脾細胞数 1×10^7 個/ml、菌標品作用濃度 0.05KE/ml および培養時間24乃至48時間にて得られることが報告されていることから、正常 BALB/cマウスより調製した脾細胞の5% FCS 加 RPMI 1640培地浮遊液 (1×10^7 細胞/ml) に各菌標品を0.05KE/ml 加え、炭酸ガス培養器 (炭酸ガス濃度5%) にて37°Cで48時間培養することにより、IFN を誘起した。次いで、その培養液を遠心 (100g, 10分間) した後得られた上清液中の IFN 活性

を測定し、これらの IFN 含有培養上清液 (IFN 上清液) を5% FCS 加 RPMI 1640培地で希釈して、脾細胞の活性化に用いた。IFN 上清液は、使用時まで-80°Cに冷凍保存した。以下、各菌標品による IFN 上清液を、それぞれ、Su-IFN 上清液、C203S-IFN 上清液、C203U-IFN 上清液および Blackmore-IFN 上清液と略記する。

VI. IFN 活性の測定法

東北大学医学部細菌学教室より供与された L929 細胞および vesicular stomatitis virus (インディアナ株, VSV) を用い、Brodeur³⁴⁾ および Koi³⁵⁾ らの方法に従い IFN 上清液中の IFN 活性を測定した。すなわち、7.5% 子牛血清 (GIBCO) 加 MEM を用いて倍々希釈した各 IFN 上清液の希釈液 $50 \mu\text{l}$ をマイクロプレート (96穴) (CORNING) の各ウェルに注入し、これに L929 細胞浮遊液 (1.5×10^6 個/ml) $50 \mu\text{l}$ を加えて炭酸ガス培養器 (炭酸ガス濃度5%) にて37°Cで24時間培養した。培養後上清液をパスツールピペットで吸引除去した後、各ウェルの L929 細胞を PBS 0.3ml で洗浄し、これに VSV 溶液 (MEM で希釈、40 plaque forming units/ $50 \mu\text{l}$) を添加し、これを炭酸ガス培養器に静置した。1時間後 VSV 培養液を吸引除去した後、1.5% メチルセルロース (半井化学、京都) 加 1.5% FCS 加 MEM $50 \mu\text{l}$ を重層し、炭酸ガス培養器で24時間培養した。培養後重層培地を吸引除去したマイクロプレートを、1% クリスタルバイオレット (Merck) 加エチルアルコールに浸し、15分間染色固定した。次いで、水洗を行いプラーク数を求めた。対照として、IFN 無注入 L929 細胞の VSV によるプラーク数を用い、IFN 活性値は、対照プラーク数の50%に減少させる IFN 上清液の最高希釈濃度の逆数で表した (50% プラーク阻止法)。なお測定に際し、NIH 標準マウス IFN (No. 022-904-511) も同時に測定し、本実験系により求めた IFN 活性値を国際単位と比較した。その結果、本実験系における1単位は約1単位の国際単位に相当した。

VII. IFN 上清液による脾細胞の活性化

正常マウス脾細胞の浮遊液に IFN 上清液を加え、IFN 100U/ml または 30U/ml 含有 1×10^7 脾細胞/ml の5% FCS 加 RPMI 1640培地浮遊液を調製した。60mm 径プラスチックシャーレ 25010 (CORNING) にこの細胞浮遊液 10ml を入れて、炭酸ガス培養器 (炭酸ガス濃度5%) にて37°Cで18時間培養した。培養後、プラスチックシャーレ内の全細胞をラバーポリスマンにて回収して遠心 (100g, 10分間) した後上清液を吸引除去し、沈渣を8ml の冷ハンクス液 (pH 7.2)

で3回遠心・洗浄した。得られた沈渣に1.5mlの冷ハンクス液を加えて浮遊させ、生存脾細胞数をトリパンブルー (Merck) による色素排除テストにて計数した後、さらに冷ハンクス液を加えて希釈し、 5×10^7 細胞/mlの活性化脾細胞浮遊液を調製した。

VIII. Meth-A 肉腫細胞浮遊液の調製

Meth-A 肉腫細胞腹腔内移植9日目のBALB/cマウスより腹水を採取し、ハンクス液に浮遊させて遠心(25g, 10分間)して上清液を吸引除去後、沈渣をトリス緩衝塩化アンモニウム溶液4ml中に浮遊させて3分間静置し赤血球を溶血させた。次いで、ハンクス液にて3回遠心・洗浄後、再びハンクス液に浮遊させ、 5×10^6 細胞/mlのMeth-A肉腫細胞浮遊液を調製した。

IX. 活性化脾細胞による腫瘍細胞中和試験 (Winnのテスト)

IFN上清液処理による活性化脾細胞の、*in vivo*でのMeth-A肉腫細胞に対する増殖抑制効果をWinnのテストにより調べた。すなわち、腫瘍細胞と活性化脾細胞の混合比が1:10になるように、Meth-A肉腫細胞浮遊液(5×10^6 細胞/ml)と活性化脾細胞浮遊液(5×10^7 細胞/ml)を等量混合した液を作製し、この混液0.2ml(5×10^5 Meth-A細胞)を一群7~10匹のBALB/cマウス側腹部皮下に移植し、腫瘍の増殖を21日間観察した。腫瘍の大きさは、長径(Lmm)と短径

(Smm)の平均値(L+S)/2mmで表示し、さらに21日目の腫瘍湿重量を測定した。

X. 統計学的検定

得られた成績は、すべて平均値と標準誤差(S.E.)

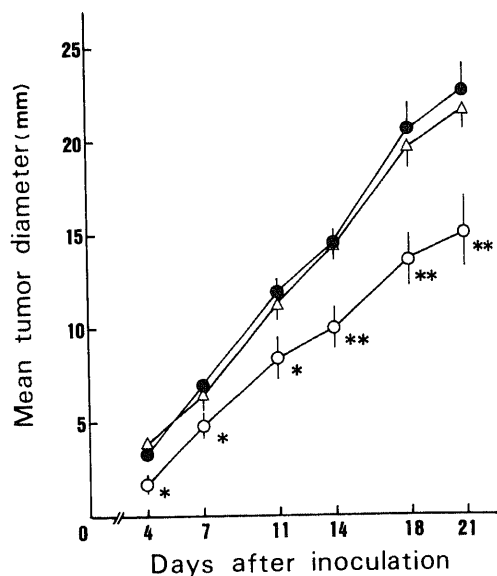


Fig. 1. Effect of spleen cells pretreated with culture supernatant of *Su* coccal preparation on the growth of Meth-A sarcoma cells. Experiment on effect of spleen cells was carried out by Winn's assay. Mouse spleen cells (1×10^7 cells/ml) were incubated with culture supernatant containing IFN (100 U/ml) induced by *Su* coccal preparation (*Su*-IFN sup.) at 37°C for 18 hr, and mixed with Meth-A sarcoma cells in a cell ratio of 10:1. The mixture containing 5×10^5 Meth-A cells was inoculated subcutaneously into a BALB/c mouse. Meth-A cells alone or Meth-A cells mixed with spleen cells incubated without *Su*-IFN sup. at 37°C for 18 hr were also inoculated into a mouse. Growth of the solid tumor was observed for 21 days, and the tumor weight on 21th day after inoculation was measured. Each value (mm) represents mean tumor diameter \pm standard error of the mean (S. E. M.) of seven to ten mice. Mean tumor diameter (mm) was expressed as (long diameter+short diameter)/2. ○, Meth-A cells mixed with *Su*-IFN sup.-treated spleen cells; ●, Meth-A cells mixed with non-treated spleen cells; △, Meth-A cells alone. *Significantly different from group of Meth-A cells mixed with non-treated spleen cells, $p < 0.05$ (with the Student's *t*-test). **Significantly different from group of Meth-A cells mixed with non-treated spleen cells, $p < 0.01$.

Table 2. IFN activity of culture supernatants of spleen cells and various streptococcal preparations^{a)}

Streptococcal preparation	Activity of IFN ^{b)} (U/ml)
Su (OK-432)	250
C203S	50
C203U	110
Blackmore	120

a) Coccal suspension of strain *Su*, 203S, C203U or Blackmore in Bernheimer's basal medium containing penicillin G (2.7×10^4 U/ml) was incubated at 37°C for 20 min followed by incubation at 45°C for 30 min and lyophilized.

b) Spleen cells (1×10^7 cells/ml) suspended in RPMI1640 medium supplemented with 5% fetal calf serum (FCS) were incubated with coccal preparation (0.05 KE/ml) in 5% CO_2 incubator at 37°C for 48 hr. After incubation, IFN activity of the culture supernatant was assayed. KE, one KE corresponds to 0.1mg dried cocci.

M.) で表した. 2 群間の平均値の差の検定は, Student t 検定により行い, $p < 0.05$ を有意とした.

成 績

I. IFN 上清液中の誘起 IFN 活性

脾細胞数 1×10^7 個/ml と菌標品濃度 0.05 KE/ml の等量混合液を, 炭酸ガス培養器 (炭酸ガス濃度 5%) にて 37°C で 48 時間培養した. これにより得られた誘起 IFN 含有培養上清液 (IFN 上清液) 中の IFN 活性は, 表 2 に示した如く, 誘起 IFN 活性は Su 菌で最も強く, Blackmore 菌と C203U 菌はほとんど同程度で, これにつづき C203S 菌は最も弱かった.

II. 脾細胞活性化に関する実験

Winn のテストによって行われた脾細胞の活性化についての実験成績は次の如くであった.

1. IFN 作用濃度 100 U/ml を用いた脾細胞活性化実験

Su 菌, C203S 菌および Blackmore 菌の各菌標品により得られた IFN 上清液を用いて IFN 濃度を 100 U/ml として活性化した脾細胞の Meth-A 肉腫細胞に対する抗腫瘍効果を, 先に記した如くにして Winn のテストにより検討した. Meth-A 細胞と活性化脾細胞または IFN 非処理脾細胞 (対照脾細胞) を 1:10 の細胞数比に混じた Meth-A 細胞, ならびに脾細胞と混じ

てない Meth-A 細胞を, 正常 BALB/c マウス側腹部皮下に移植し, 腫瘍の増殖を 21 日間観察した成績は, 図 1~3 に示した如くである.

1) Su-IFN 上清液による脾細胞活性化実験成績

脾細胞を混ぜずに Meth-A 細胞のみを移植したマウスでは, 図 1 に示した如く, 腫瘍径は時間と共に増大し, 21 日目には腫瘍径で $21.6 \pm 1.0\text{mm}$, 腫瘍湿重量で $3.4 \pm 0.4\text{g}$ を示した. また, 対照脾細胞と混じて移植した Meth-A 細胞もほぼ同様の増殖をたどり, 21 日目の腫瘍径は $22.7 \pm 1.4\text{mm}$, 腫瘍湿重量は $3.9 \pm 0.4\text{g}$ と, Meth-A 細胞のみを移植したのと同様であった. これに対し, 活性化脾細胞と混じて移植した Meth-A 細胞の腫瘍径は, 対照脾細胞のものと比較して常に小さく, 21 日目の腫瘍径は $15.1 \pm 1.9\text{mm}$, 腫瘍湿重量は $1.6 \pm 0.5\text{g}$ と, 腫瘍の増殖は有意に抑制されていた.

2) C203U-IFN 上清液による脾細胞活性化実験成績

脾細胞を混じない Meth-A 細胞ならびに対照脾細胞を混じた Meth-A 細胞を移植したマウスでは, 図 2 に示した如く, ほぼ同一の腫瘍増殖を示し, 21 日目では, それぞれ, 腫瘍径は $19.7 \pm 1.2\text{mm}$ および $20.1 \pm 0.9\text{mm}$, 腫瘍湿重量は $3.4 \pm 0.6\text{g}$ および $3.3 \pm 0.3\text{g}$ であった. これに対し, 活性化脾細胞を混じて移植した

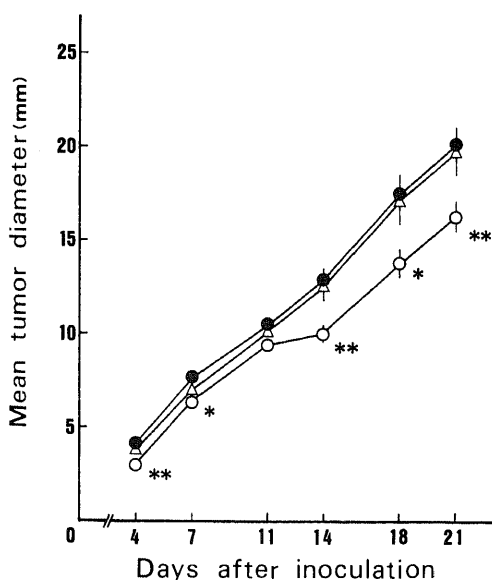


Fig. 2. Effect of spleen cells pretreated with culture supernatant of C203U coccal preparation on the growth of Meth-A cells. Refer to footnote of Fig. 1.

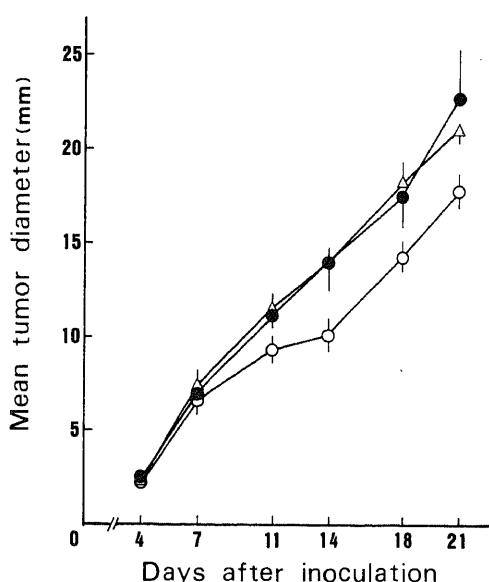


Fig. 3. Effect of spleen cells pretreated with culture supernatant of Blackmore coccal preparation on the growth of Meth-A cells. Refer to footnote of Fig. 1.

Meth-A 細胞の腫瘍径は、対照脾細胞と混じて移植した Meth-A 細胞のそれより常に小さく、21日目の腫瘍径は 16.3 ± 0.8 mm、腫瘍湿重量は 1.9 ± 0.3 g と、Meth-A 細胞の増殖は有意に抑制されており、Su-IFN 上清液によるものと同様な結果が得られた。

3) Blackmore-IFN 上清液による脾細胞活性化実験成績

脾細胞を混ぜずに移植した Meth-A 細胞ならびに対照脾細胞を混じて移植した Meth-A 細胞はともに図3に示した如く、同様な腫瘍の増殖を示し、21日目で、それぞれ、腫瘍径は 21.1 ± 0.8 mm および 22.7 ± 2.6 mm、腫瘍湿重量は 3.5 ± 0.4 g および 4.1 ± 0.9 g であった。これに対し、活性化脾細胞を混じて移植した Meth-A 細胞は、対照脾細胞のものに比し、腫瘍径では、21日目で 17.8 ± 0.9 mm と明らかな増殖抑制効果はみられなかったが、腫瘍湿重量は 1.9 ± 0.3 g と、対照と比べて腫瘍増殖が有意に抑制されていた。

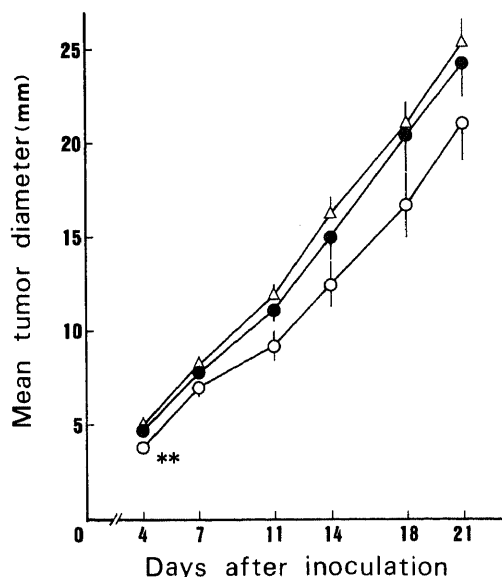


Fig. 4. Effect of spleen cells pretreated with culture supernatant of Su coccal preparation on the growth of Meth-A cells. Experiment was carried out by the procedure described in footnote of Fig. 1. However mouse spleen cells were incubated with culture supernatant containing IFN (30 U/ml) induced by Su coccal preparation and mixed with Meth-A cells in a cell ratio of 10 : 1. Then the mixture was inoculated subcutaneously into a mouse. Refer to footnote of Fig. 1.

2. IFN 作用濃度 30 U/ml を用いた脾細胞活性化実験

Su-IFN および C203S-IFN 上清液を用いて、IFN を 30 U/ml 含む IFN 上清液中で活性化した脾細胞の Meth-A 肉腫細胞に対する抗腫瘍効果を、Winn のテストにて検討した。すなわち、Meth-A 細胞と活性化脾細胞または対照脾細胞を 1 : 10 に混じてマウスに移植し、腫瘍の増殖を21日間観察した結果は、図4、5の如くである。

1) Su-IFN 上清液による脾細胞活性化実験成績

脾細胞を混ぜずに移植した Meth-A 細胞ならびに対照脾細胞を混じて移植した Meth-A 細胞は、図4に示した如く、時間の経過とともに直線的な腫瘍増大を示し、21日目で、それぞれ、腫瘍径は 25.4 ± 1.2 mm および 24.3 ± 1.8 mm、腫瘍湿重量は 5.7 ± 0.7 g および 5.3 ± 1.0 g であった。これに対し、活性化脾細胞を混じて移植した Meth-A 細胞は、対照脾細胞のものに比し腫瘍径は常に小さかったが時間の経過とともに腫瘍は直線的に増殖し、21日目で、腫瘍径は 21.1 ± 2.0 mm、腫瘍湿重量は 3.8 ± 0.9 g と、対照群とは有意な差はなかった。

2) C203S-IFN 上清液による脾細胞活性化実験成績

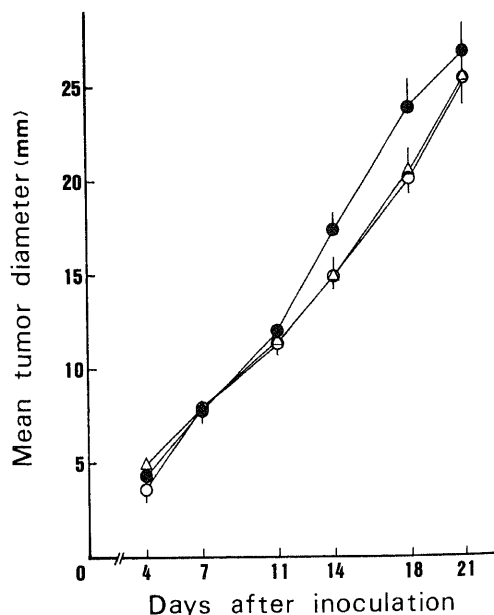


Fig. 5. Effect of spleen cells pretreated with culture supernatant of C203S coccal preparation on the growth of Meth-A cells. Refer to footnote of Fig. 4.

脾細胞を混じらなかった Meth-A 細胞, 対照脾細胞を混じた Meth-A 細胞ならびに活性化脾細胞を混じた Meth-A 細胞は, 図 5 に示した如く, いずれも時間とともに直線的な腫瘍増殖を示し, 21 日目, それぞれ, 腫瘍径は $25.5 \pm 1.1\text{mm}$, $26.9 \pm 1.5\text{mm}$ および $25.3 \pm 1.2\text{mm}$, 腫瘍湿重量は $6.0 \pm 0.7\text{g}$, $7.4 \pm 0.8\text{g}$ および $5.7 \pm 0.7\text{g}$ であり各群では共に有意な増殖抑制効果を認められなかった。

考 察

OK-432 誘起 IFN γ は直接的に³⁶⁾³⁷⁾あるいは抗腫瘍性マクロファージの誘導¹⁾¹⁴⁾や NK 細胞活性の増強³⁷⁾³⁸⁾を介して間接的に抗腫瘍効果を示すことが報告されており, OK-432 の抗腫瘍作用を考える上で重要な経路であることが示唆されている。

本実験で用いた A 群溶連菌のうち, SLS 産生能を有する Su 菌, C203S 菌および Blackmore 菌は抗腫瘍性を持ち, SLS 産生能を持たない C203U 菌には抗腫瘍性がみられないことが, Okamoto ら⁷⁾²⁸⁾により実証されている。しかしながら, これらの抗腫瘍性ならびに非抗腫瘍性溶連菌菌株で正常無処置マウス脾細胞を刺激すると, 同様に IFN を誘起し, 誘起された IFN は共に α , β , γ を含有し, また, α , β , γ の含有比も各菌株誘起 IFN 間では殆ど同じであることが池田²⁹⁾により示された。また, 池田は, 活性が最も強い IFN は, 脾細胞数 1×10^7 個/ml, 菌標品作用濃度 0.05KE/ml , 培養時間 24 乃至 48 時間であることを示し, 48 時間培養後に得られた IFN 活性値は, Su 菌, C203S 菌, C203U 菌および Blackmore 菌標品で, それぞれ 181U/ml , 140U/ml , 126U/ml および 157U/ml であった。このことより本実験では, 池田と同じ条件下で IFN を誘起したが, これらの IFN 活性値は, それぞれ 250U/ml , 50U/ml , 110U/ml および 120U/ml であり, 実験に用いられたすべての菌株により IFN が誘起されることが確認されたが, 活性値については若干異なり, その理由については不明であった。この様に抗腫瘍性溶連菌および非抗腫瘍性溶連菌は共に IFN を誘起し, 誘起 IFN は定性・定量的にも, また活性にも殆ど差が認められなかったことから, 各菌株誘起 IFN に生物学的活性すなわち脾細胞の抗腫瘍性活性化に差異があるか否かが問題視されるに至ったため本実験が行われた。すなわち, 各 IFN 上清液により活性化された脾細胞の Meth-A 肉腫細胞に対する腫瘍抑制効果を, Winn のテストにより調べた。その結果, IFN を 100U/ml 含む IFN 上清液中で活性化した脾細胞のうち, Su-IFN および C203U-

IFN 上清液による活性化脾細胞は同様に明らかな腫瘍増殖抑制効果を認めた。しかし, Blackmore-IFN 上清液によるものは, その腫瘍径の観察では明らかな抗腫瘍効果を示さなかったが, 腫瘍重量では有意な抑制効果が認められ, Su-IFN および C203U-IFN 上清液によるものと同様に腫瘍増殖抑制効果を有すると考えられた。次に, IFN 濃度を 30U/ml として行った Su-IFN および C203S-IFN 上清液での実験では, 有意な腫瘍増殖抑制効果が認められなかったが, IFN 濃度を 100U/ml として行った実験において, Su-IFN 上清液で活性化した脾細胞が有意な抗腫瘍効果を示していることから, IFN の作用濃度が大きく影響しているものと考えられる。このことより, C203S 菌以外の各菌の IFN 上清液により活性化された脾細胞は同様に抗腫瘍活性を持つことが示された。溶連菌各菌株誘起 IFN が脾細胞を活性化することは, 斎藤ら¹⁴⁾が, OK-432 誘起 IFN γ を部分精製して, その抗腫瘍性を Winn のテストにより Meth-A 細胞に対し検討した結果とほぼ一致し, その抗腫瘍性は IFN γ により活性化された抗腫瘍性マクロファージによるものであるとの報告をしており, 本実験で示された IFN 上清液による活性化脾細胞の抗腫瘍効果も主に IFN γ の作用によるものと考えられた。しかしながら, 本実験で用いた IFN 上清液は, 正常無処置 BALB/c マウス脾細胞と各菌標品を培養して得られた上清液を実験に用いたものであるが, OK-432 を以前に投与 (前感作) しておいたマウスの脾細胞を OK-432 で刺激すると IFN γ のみならず IL-2 や NK 細胞活性化因子が産生されることなど, OK-432 の前感作による様々なサイトカインの産生が報告²⁹⁾されていることから, 本実験においても IFN γ 以外の可溶性因子の関与は否定できず, 今後検討が必要であると考えられた。

以上より, 抗腫瘍性の有無に関わらず, A 群溶連菌の各株はすべてに IFN 誘起能を有し, 各誘起 IFN は, その脾細胞活性化による抗腫瘍性には差のない同様な生物活性をもつことが示され, OK-432 の抗腫瘍作用を考える上でも重要な結果が得られた。すなわち, 斎藤ら¹⁴⁾は, OK-432 の作用機序として, OK-432 で誘起された IFN γ が抗腫瘍性マクロファージを活性化することにより抗腫瘍効果を示すことが重要であると考えているが, 本実験において, 抗腫瘍性をもたない C203U 菌が, 抗腫瘍性を有する Su 菌, C203S 菌および Blackmore 菌と同様に IFN を誘起し, かつ誘起 IFN が抗腫瘍活性を有することが示されたことにより, 各種 A 群溶連菌の示す抗腫瘍活性と IFN 誘起能とは直接的な関係はないと考えられ, 抗

腫瘍性の発現に他の主要な経路の存在が示唆された。このことより、OK-432 の抗腫瘍作用を明らかにする上でも、尚一層のA群溶連菌各株の比較検討が必要と考えられた。

結 論

A群溶連菌において、抗腫瘍性を有する Su 菌、C203S 菌および Blackmore 菌、ならびに抗腫瘍性を欠く C203U 菌を、OK-432 の調製法に準じて標品化し、各菌標品の正常 BALB/cマウス脾細胞での IFN 誘起能を検討し、さらに誘起 IFN の生物学的活性すなわち抗腫瘍活性を比較検討するために、各誘起 IFN 含有培養上清液により活性化された脾細胞の Meth-A 肉腫細胞に対する抗腫瘍効果を Winn のテストにより調べ、次の如き結果を得た。

1. C203U 菌標品は、Su 菌、C203S 菌および Blackmore 菌標品と同様に IFN を誘起した。

2. C203U 菌標品により誘起された IFN は、Su 菌および Blackmore 菌標品により誘起された IFN と同様に脾細胞を活性化し、有意な抗腫瘍活性を示した。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました恩師正印達教授に深甚なる謝意を表します。また本研究の遂行にあたり常に適切な御指導と御教示を賜りました川尻博男講師に深く感謝します。また多大なる御協力を賜りました中外製薬応用研究所齊藤元男主任研究員に感謝致します。

文 献

- 1) Busch, W. : Verhandlungen ärztlicher Gesellschaften. Berl. Klin. Wochenschr., 5, 137-138 (1868).
- 2) Fehleisen : Über die Züchtung der Erysipelkokken auf Künstlichem Nährboden und ihre Übertragbarkeit auf den Menschen. Dtsch. Med. Wochenschr., 8, 553-554 (1882).
- 3) Coley, W. B. : Contribution to the knowledge of sarcoma. Ann. Surg., 14, 199-220 (1891).
- 4) Okamoto, H. : Über Die hochgradige Steigerung des Hämolyisinbildungsvermögens des Streptococcus haemolyticus durch Nukleinsäure. I. Mitt. Japan J. Med. Sci., IV. Pharmacology, 12, 167-208 (1940).
- 5) Koshimura, S., Murasawa, K., Nakagawa, E., Ueda, M., Bando, Y. & Hirata, R. : Experi-

mental anticancer studies. Part III. On the influence of living hemolytic streptococci upon the invasion power of Ehrlich ascites carcinoma in mice. Japan J. Exp. Med., 25, 93-102 (1955).

6) Okamoto, H., Shoin, S., Minami, M., Koshimura, S. & Shimizu, R. : Experimental anticancer studies. Part XXX. Factors influencing the streptolysin S-forming ability of streptococci having anticancer activity. Japan J. Exp. Med., 36, 161-174 (1966).

7) Okamoto, H., Shoin, S., Koshimura, S. & Shimizu, R. : Studies on the anticancer and streptolysin S-forming abilities of hemolytic streptococci. Japan J. Microbiol., 11, 323-336 (1967).

8) Sakurai, Y., Tsukagoshi, S., Satoh, H., Akiba, T., Suzuki, S. & Takagaki, Y. : Tumor-inhibitory effect of a streptococcal preparation (NSC-B116209). Cancer Chemother. Rep., Part 1, 56, 9-17 (1972).

9) Ono, T., Kurata, S., Wakabayashi, K., Sugawara, Y., Saito, M. & Ogawa, H. : Inhibitory effect of a streptococcal preparation (OK-432) on the nucleic acid synthesis in tumor cells *in vitro*. Gann, 64, 59-69 (1973).

10) Watabe, S., Sendo, F., Kimura, S. & Arai, S. : Activation of cytotoxic polymorphonuclear leukocytes by *in vivo* administration of a streptococcal preparation, OK-432. J. Nat. Cancer Inst., 72, 1365-1370 (1984).

11) Ishii, Y., Yamaoka, H., Toh, K. & Kikuchi, K. : Inhibition of tumor growth *in vivo* and *in vitro* by macrophages from rats treated with a streptococcal preparation, OK-432. Gann, 67, 115-119 (1976).

12) 田中憲一, 鈴木利光, 大星章一 : 溶連菌製剤 OK-432 処理マクロファージの抗腫瘍性に関する研究。癌と化療, 5, 1233-1241 (1978).

13) 溝口靖紘, 筒井ひろ子, 阪上吉秀, 東森俊博, 門奈文之, 山本祐夫, 森沢成司 : OK-432 によって活性化されたマウス腹腔浸出細胞の腹水肝癌 (NH134) に対する細胞障害性。日臨免疫会誌, 5, 281-286 (1982).

14) 齊藤元男, 青沼悦子, 野田哲生, 中館一郎, 南條正季, 海老名卓三郎, 石田名香雄 : OK-432 の抗腫瘍効果 (2) - OK-432 誘起活性化 Mφ の抗腫瘍性 -。癌と化療, 10, 1363-1371 (1983).

- 15) Oshimi, K., Kano, S., Takaku, F. & Okumura, K.: Augmentation of mouse natural killer cell activity by a streptococcal preparation, OK-432. *J. Nat. Cancer Inst.*, **65**, 1265-1269 (1980).
- 16) Wakasugi, H., Oshimi, K., Kasahara, T., Miyata, M. & Morioka, Y.: In vitro augmentation of human natural killer (NK) cell activity by a streptococcal preparation OK-432 and its extracts, protein M and polysaccharides. *Int. Archs Allergy appl. Immun.*, **67**, 322-328 (1982).
- 17) Uchida, A. & Micksche, M.: Intraleural administration of OK-432 in cancer patients: Activation of NK cells and reduction of suppressor cells. *Int. J. Cancer*, **31**, 1-5 (1983).
- 18) Hojo, H. & Hashimoto, Y.: Cytotoxic cells induced in tumor-bearing rats by a streptococcus preparation (OK-432). *Gann*, **72**, 692-699 (1981).
- 19) 石田名香雄, 斉藤元男, 南條正季: OK-432 の制癌性-LAK 細胞の誘導-. *癌と化療*, **11**, PART. II, 2681-2690 (1984).
- 20) Aoki, I., Kvedar, J. P., Hollis, V. W. Jr. & Bushar, G. S.: Brief communication: Streptococcus pyogenes preparation OK-432: Immunoprophylactic and immunotherapeutic effects on the incidence of spontaneous leukemia in AKR mice. *J. Nat. Cancer Inst.*, **56**, 687-690 (1976).
- 21) Matsubara, S., Suzuki, F. & Ishida, N.: Induction of immune interferon in mice treated with a bacterial immunopotentiator, OK-432. *Cancer Immunol. Immunother.*, **6**, 41-45 (1979).
- 22) Saito, M., Ebina, T., Koi, M., Yamaguchi, T., Kawade, Y. & Ishida, N.: Induction of interferon- γ in mouse spleen cells by OK-432, a preparation of streptococcus pyogenes. *Cell Immunol.*, **68**, 187-192 (1982).
- 23) Ichimura, O., Suzuki, S., Sugawara, Y. & Osawa, T.: Lymphokines induction by streptococcal preparation OK-432 (picibanil) in mice: Characterization of interleukin 1 (IL-1), interleukin 2 (IL-2) and natural killer cell activating factor (NKAF). In Hoshino, T. & Uchida, A. (eds.) *Clinical and Experimental Studies in Immunotherapy*, 17th ed., p48-70, Excerpta Medica, Amsterdam, 1984.
- 24) Wakasugi, H., Kasahara, T., Minato, N., Hamuro, J., Miyata, M. & Morioka, Y.: In vitro potentiation of human natural killer cell activity by a streptococcal preparation, OK-432: Interferon and interleukin-2 participation in the stimulation with OK-432. *J. Nat. Cancer.*, **69**, 807-812 (1982).
- 25) Ichimura, O., Suzuki, S., Sugawara, Y. & Osawa, T.: Characterization of mouse natural killer cell activating factor (NKAF) induced by OK-432: Evidence for interferon- and interleukin 2-independent NK cell activation. *Br. J. Cancer*, **50**, 97-108 (1984).
- 26) 漆崎一郎, 新津洋司郎, 渡辺直樹: TNF の定義と産生機序. *癌と化療*, **11**, 1356-1368 (1984).
- 27) Ginsburg, I. & Grossowicz, N.: Effect of streptococcal haemolysins on Ehrlich ascites tumour cells. *J. Path. Bact.*, **80**, 111-119 (1960).
- 28) 越村三郎, 西田信義, 坂東 勲, 正印 達, 南幹雄, 角野光司: 制癌に関する実験的研究, 第26報. Streptolysin-O のみの産生能を有する溶連菌の無効性について. *金大結核年報*, **23**, 61-66 (1965).
- 29) 池田周紹: マウス脾細胞でのインターフェロン誘起に対する A 群溶連菌の影響. *十全医会誌*, **92**, 423-433 (1983).
- 30) Winn, H. J.: Immune mechanisms in homo-transplantation. II. Quantitative assay of the immunologic activity of lymphoid cells stimulated by tumor homografts. *J. Immunol.*, **86**, 228-239 (1961).
- 31) Okamoto, H., Minami, M., Shoin, S., Koshimura, S. & Shimizu, R.: Experimental anticancer studies. Part XXXI. On the streptococcal preparation having potent anticancer activity. *Japan J. Exp. Med.*, **36**, 175-186 (1966).
- 32) Bernheimer, A. W.: Formation of a bacterial toxin (streptolysin S) by resting cells. *J. Exp. Med.*, **90**, 373-392 (1949).
- 33) Shirahata, T. & Shimizu, K.: Production and properties of immune interferon from spleen cell cultures of *toxoplasma*-infected mice. *Microbiol. Immunol.*, **24**, 1109-1120 (1980).
- 34) Brodeur, B. R., Weinstein, Y., Melmon, K. L. & Merigan, T. C.: Reciprocal changes in interferon production and immune responses of mouse spleen cells fractionated over columns of insolubilized conjugates of histamine. *Cell Immunol.*, **29**, 363-372 (1977).
- 35) Koi, M., Saito, M., Ebina, T. & Ishida,

N.: Lactate dehydrogenase-elevating agent is responsible for interferon induction and enhancement of natural killer cell activity by inoculation of Ehrlich ascites carcinoma cells into mice. *Microbiol. Immunol.*, **25**, 565-574 (1981).

36) Rubin, B. Y. & Gupta, S. L.: Differential efficacies of human type I and type II interferons as antiviral and antiproliferative agents. *Proc. Natl. Sci. USA*, **77**, 5928-5932 (1980).

37) 齊藤元男, 山口高広, 青沼悦子, 野田哲生, 海老名卓三郎, 石田名香雄: OK-432 の抗腫瘍効果(1) - OK-432 誘起インターフェロン- γ (IFN γ) の抗腫瘍効果 - 癌と化療, **9**, 2031-2037 (1982).

38) Wakasugi, H., Oshimi, K., Miyata, M. & Morioka, Y.: Augmentation of natural killer (NK) cell activity by a streptococcal preparation, OK-432, in patients with malignant tumors. *J. Clin. Immunol.*, **1**, 154-162 (1981).

Anti-tumor Activity of Interferon Induced by Group A Hemolytic Streptococci in Mouse Spleen Cells Shuichi Kikuchi, Department of Pharmacology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-J. *Juzen Med. Soc.*, **97**, 1137-1146 (1988)

Key words: group A hemolytic streptococci, OK-432, mouse spleen cell, induced-IFN, Winn's assay

Abstract

It has been reported that strains of group A hemolytic streptococci have an ability to induce interferon (IFN), irrespectively of their anticancer activities, and also that the induced-IFNs were not different in their qualitative and quantitative properties. Therefore, anti-tumor activity of the IFNs induced by streptococcal strains Su, C203S and Blackmore with both anticancer- and SLS-producing abilities, and a strain C203U without either of these abilities, was examined. Penicillin G-treated and lyophilized preparations of these streptococci were prepared according to the procedure for OK-432, Su coccal preparation. Briefly coccal cells of each strain grown in a broth culture for 20 hr were suspended in Bernheimer's basal medium containing penicillin G and incubated at 37°C for 20 min, then at 45°C for 30 min and lyophilized. IFN activities of culture supernatants of normal BALB/c mouse spleen cells and these coccal preparations after incubation at 37°C for 48 hr were assayed by using L929 cells and vesicular stomatitis virus. As the result, all preparations induced IFNs approximately to the same amounts. Then, anti-tumor activity of mouse spleen cells activated with these culture supernatants containing induced-IFN was examined by a tumor neutralization test (Winn's assay). Mouse spleen cells incubated with the culture supernatant containing the induced-IFN (100 U/ml or 30 U/ml) at 37°C for 18 hr were mixed with Meth-A sarcoma cells at an Effector/Target cell ratio of 10, and the mixture was inoculated subcutaneously into a BALB/c mouse on the flank. Tumor growth was observed for 21 days. The result was as follows. Mouse spleen cells activated with the culture supernatant containing 100 U/ml of IFN induced by coccal preparation of Su, Blackmore or C203U strain, significantly inhibited tumor growth. Thus, it was shown that strain C203U without anticancer ability induced IFN as well as strains Su and Blackmore with anticancer ability did, and that there was no difference in biological activity observed by Winn's assay among these IFNs.